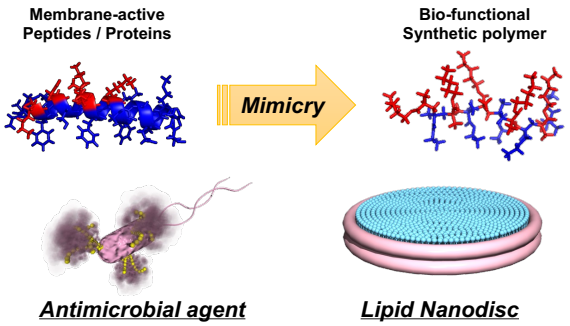
Accounts of Materials & Surface Research

Biomimetic design of membrane-active bio-functional molecules

Kazuma Yasuhara [1,2*]
[1]*Division of Materials Science, Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology (NAIST)*
[2]*Center for Digital Green-innovation, Nara Institute of Science and Technology (NAIST)*
8916-5 Takayama, Ikoma, Nara, 6300192, Japan
yasuhara@ms.naist.jp

The roles of biomembranes are not limited to the barrier wall, but they also provide functional interfaces for various biological functions such as intracellular and extracellular signal transduction, material transport, and energy production. The essential functions of biomembranes are established on the complex supramolecular networks of lipid bilayers and membrane proteins. Inspired by the amphiphilic structures commonly found in membrane-active proteins and peptides, several synthetic functional polymers have been previously designed. The functional mimic of proteins and peptides using synthetic polymer is challenging due to the lack of specific monomer sequence, however, the synthetic polymers enable inexpensive synthesis at a large scale and a variety of chemical modifications. Additionally, mimicking the function of natural proteins using a simplified molecular framework is expected to provide a minimal design guideline for membrane-active functional molecules. This article focuses on the design and evaluation of synthetic polymers that mimic membrane-disruptive antimicrobial peptides as well as lipid nanodisc-forming apo-lipoproteins.



Keyword: *Peptidomimetics, Lipid bilayer, Antimicrobial peptide, Lipid nanodisc, Amphiphilic polymer*

Dr. Kazuma Yasuhara received his Ph. D. degree from Nara Institute of Science and Technology in 2008. He became an Assistant professor at the Graduate School of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology in 2009. From 2013 to 2014, he worked at the Department of Pharmaceutical Chemistry, University of California, San Francisco as a Visiting Assistant Professor. In 2018, he was promoted to an Associate Professor in the Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology. His current research interests are the biomimetic design of bio-functional materials and their physicochemical characterization.

生体膜に作用する機能性分子のバイオミメティック・デザイン

安原　主馬 [1, 2*]
1 奈良先端科学技術大学院大学　先端科学技術研究科　物質創成科学領域
2 奈良先端科学技術大学院大学　デジタルグリーンイノベーションセンター

1. はじめに

細胞やその小器官を形作る生体膜は、単なる隔壁としての役割に留まらず、細胞内外の情報伝達や物質輸送、また光合成に代表されるようなエネルギー生産といった生命機能にとって欠かすことのできない重要な機能を担っている[1]。生体膜のもつこれらの機能は、脂質二分子膜と膜タンパク質が超分子ネットワークを形成することで実現している。また、膜の物性を変化させることで膜透過や膜の形態変化といった機能を誘導することのできるタンパク質のドメインやペプチドも多く見いだされており、新たな生体機能性材料を開発する上で、生体膜は重要なターゲットとなる。

生体膜と相互作用するタンパク質ドメインや機能性ペプチドに共通してみられる特徴は、親水性および疎水性のアミノ酸残基が同一分子骨格上に共存することによって形成される両親媒構造である。タンパク質やペプチドのもつ両親媒性構造にヒントを得て、膜と相互作用することで生体機能を誘導する合成高分子がこれまでにいくつかデザインされてきた。タンパク質やペプチドの代替として合成高分子を骨格として用いることで、安価に大量合成が可能となり、化学修飾が容易になるといった大きな利点がある一方で、モノマー配列の決まった単一の分子種を得ることが不可能であるといった点は避けられず、挑戦的な課題となる。また、単純化された分子骨格を用いて、最小限の要素でタンパク質やペプチドの機能を模倣するアプローチは、膜に作用する生体機能性分子の本質的な設計指針に迫ることができると期待される。本稿では、細菌の細胞膜を破壊することで作用する抗菌性ペプチドおよび脂質分子と複合化することでナノディスクを形成するアポリポタンパク質の機能を模倣することのできる合成高分子について我々の研究事例を中心に紹介する (Fig. 1)。

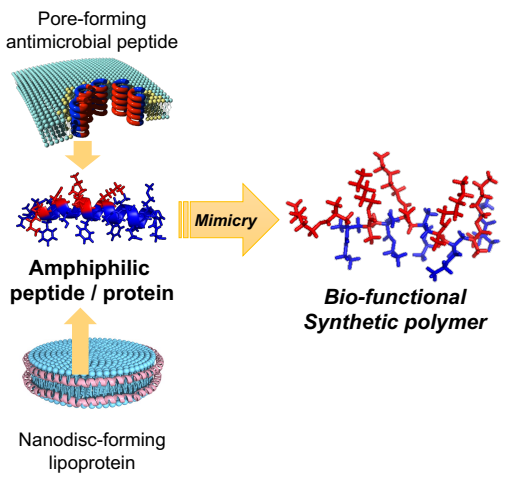


Figure 1. Biomimetic design of membrane-active bio-functional molecules using a synthetic polymer as a molecular framework.

2. 膜に作用する抗菌性ペプチドと合成高分子による模倣

自然界には、Host defense peptide (HDP)と呼ばれる抗菌性のペプチドが存在することが知られている[2]。HDP はヒトを含むほとんどの多細胞生物が有しており、原始的な免疫系として利用されてきたと考えられている。HDP は薬剤耐性を生じることなく幅広い菌種に対して効果を示すことから、従来の抗生物質に取って代わる新しい抗菌性分子として注目を集めている。ここでは、HDP の作用機構と構造上の特徴、および HDP を模倣して設計された合成高分子を骨格とした抗菌剤について紹介する。

2-1. HDP の分子構造における特徴と作用機構

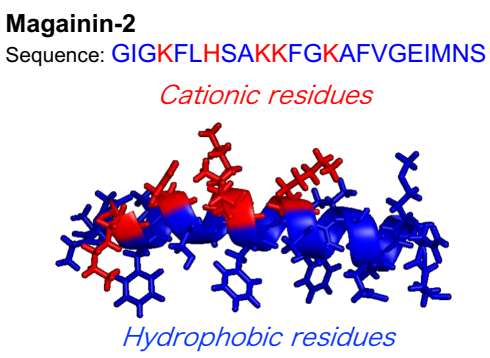


Figure 2. Facially amphiphilic structure of a host-defense peptide, Magainin-2. Cationic amino acid residues are shown in red color. (PDB: 2MAG)

HDP は、細菌の細胞膜を認識・撹乱することでそのバリア能を喪失させ、抗菌活性を誘導する。膜をターゲットとした作用機構は、特定のタンパク質をターゲットとした従来の抗生物質と大きく異なり、薬剤耐性を非常に誘導しにくいこと、多様な細菌に対して有効なことが知られている。HDP は、20～50 程度のアミノ酸残基から構成される比較的短いペプチドであり、ターゲットとなる細菌の細胞膜と宿主である多細胞生物の細胞膜を識別して選択的に攻撃する。

広く研究の進んでいる HDP の一例として、アフリカツメガエル由来の Magainin-2 を例に、HDP の分子構造における特徴を述べる[3]。Magainin-2 は、複数の塩基性アミノ酸側鎖(リシンおよびヒスチジン)を有しており、生理的条件下で正に帯電したペプチドである(Fig. 2)。作用対象となる細菌の細胞膜は、酸性脂質であるホスファチジルグリセロールやカルジオリピン等を多く含み、細胞表面は負電荷を帯びているため、正電荷を有するペプチドは多点の静電相互作用によって表面へと結合する。Magainin-2 は、水中では明確な高次構造を持たないが、膜に結合することでα-ヘリックス構造が誘起される。このとき、疎水性・親水性の側鎖がα-ヘリックスのそれぞれ別の面に局在した両親媒性構造(facially amphiphilic structure)が誘導される。このような facially amphiphilic structure は多くの抗菌性ペプチドにおいて共通してみられる構造上の特徴である。α-ヘリックスを形成したペプチドは、複数集まって脂質分子と会合し、協同的にポア(細孔)構造を形成することで、細胞質の漏出や膜電位の喪失を誘導し、最終的には細菌の細胞を死へと追いやる。HDP は、抗生物質のように結合サイトへの厳密な「鍵と鍵穴」の関係を利用した特異的な相互作用では無く、膜に対する静電相互作用や疎水効果といった非特異的な相互作用を巧みに組み合わせることで、生物種の違いに起因する生体膜の差異を認識し、抗菌活性を示していることが大きな特徴である。

2-2. HDP を模倣した合成抗菌剤の設計

これまでに、HDP の構造にヒントを得て、合成高分子を骨格とする抗菌剤を開発する試みがなされてきた。合成高分子を骨格として用いて HDP を模倣することで、体内でタンパク質分解酵素による分解を受けない、安価に大量生産が可能である、生体活性の精密なチューニングが可能であるといった多くの利点が生まれる。合成高分子による抗菌剤開発の歴史は 1980 年代まで遡ることができ、Ikeda らによって報告されたカチオン性側鎖を導入したポリスチレン誘導体にその端を発する[4]。この分子は逆性石けんとして知られる塩化ベンザルコニウムに類似した側鎖を有している。以来、様々な合成高分子を分子骨格とした抗菌性ポリマーが開発されており、その詳細については総説をご覧頂きたい[5]。HDP を模倣した抗菌性高分子に共通する設計指針は、同一高分子鎖上に疎水基とカチオン性基を導入することによる、分子全体への両親媒性の付与である。当初は、高い抗菌活性と低い生体毒性の両立が困難であったが、緻密な分子設計を行うことで、天然の HDP のように、宿主を傷つけること無く高い抗菌活性を示す抗菌性高分子がいくつか実現している。

一例として、筆者らが共同研究を行っている Kuroda らによって開発されたポリメタクリレートを基本骨格とした抗菌性高分子を紹介する(Fig. 3)。抗菌性ポリメタクリレート誘導体は、塩基性および疎水性モノマーのランダム共重合によってワンポットで合成することができる。系統的に分子構造を変化させた共重合体ライブラリを用

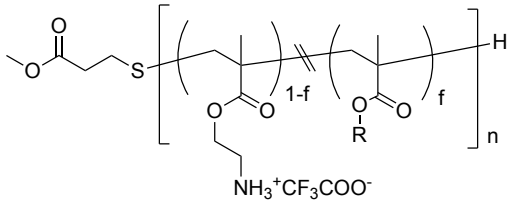


Figure 3. Chemical structure of an antimicrobial polymethacrylate derivative. R represents a hydrophobic sidechain.

いた構造−活性相関の評価より、抗菌活性および溶血毒性はいずれも、(i)疎水性モノマーの割合と構造[6]、(ii)ポリマーの分子量[7]および(iii)カチオン性基の分子構造[8]に依存することを明らかにしており、構造の最適化によって天然の HDP に匹敵する抗菌活性と低毒性を実現可能である。また近年では、ポリメタクリレート誘導体が、細菌のみならずがん細胞に対しても有効であることがわかってきた。がん細胞の表面においては、負電荷脂質であるホスファチジルセリンが多く露出していることが知られており、カチオン性の抗菌性ポリメタクリレート誘導体は細菌の場合と同様に、がん細胞の膜を認識・攪乱することで抗がん活性を示す[9]。

3. 抗菌性ポリメタクリレート誘導体と脂質膜の相互作用

筆者らは、抗菌性ポリメタクリレート誘導体を対象として、モデル細胞膜を用いた生物物理学的なアプローチから作用メカニズムの評価をこれまでに行ってきた。無数の異なる分子種によって構成される実際の細胞膜と比較して、モデル細胞膜は脂質分子のみで構成されるシンプルな構造であり、詳細なメカニズムを分子レベルで議論することができる。リン脂質が水中で自発形成する小胞であるリポソームは、最も一般的に用いられているモデル膜系である。近年では、細胞サイズのジャイアントベシクル(GV)の顕微鏡観察による膜のダイナミクス評価が注目を集めている。直径数十マイクロメートルの GV を用いることで、膜透過や形態変化、ドメイン形成といった挙動を単一ベシクル単位で *in situ* 観察をすることが可能である。ここでは、抗菌性ポリメタクリレート誘導体と脂質膜との相互作用について GV を用いた評価例を紹介する。

3-1. 抗菌性ポリメタクリレートによる膜破壊

抗菌性ポリメタクリレート誘導体は、その疎水性側鎖の構造や含有割合によって抗菌活性および溶血毒性が大きく変化する。メタクリル酸メチル(R=CH_3)を疎水性側鎖として導入したポリマー(PM)は高抗菌活性と低溶血毒性を両立することができる一方で、メタクリル酸ブチル(R=C_4H_9)を有するポリマー(PB)は抗菌活性も溶血毒性のいずれも高くなる。大腸菌モデルとして、1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE) / 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (sodium salt) (POPG)の 8:2 混合系を、赤血球モデルとして、1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC)を用いてそれぞれ静置水和法によりジャイアントベシクルを調製した。GV の内水相にはマーカーとしてスクロース(MW = 342 g·mol^{-1}, D_{hy} = 0.98 nm)を封入し、外水相はグルコース水溶液を導入することで、ポリマーによって誘導される膜破壊とそれに伴って引き起こされる膜透過を位相差顕微鏡によって観察した[10]。

抗菌性を選択的に示す PM は大腸菌モデル GV の破裂と内包分子の漏出を誘導した一方で、

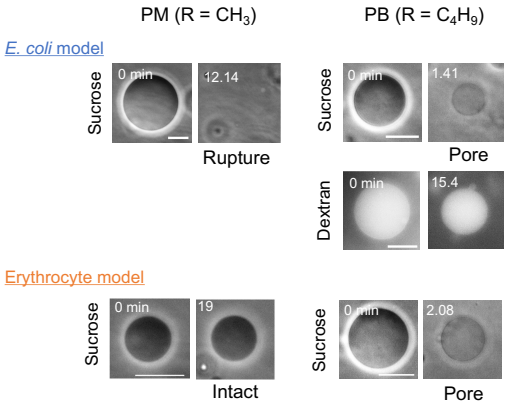


Figure 4. Membrane disruption induced by antimicrobial polymethacrylate derivatives. Bar = 10 μm. Figures are modified from [10]. Copyright 2021, American Chemical Society.

赤血球モデル GV は破壊しなかった (Fig. 4)。また、抗菌活性および溶血毒性その両方が高い PB ポリマーは、両方のモデル膜系において内包スクロースの漏出を誘導した。このことから、ポリメタクリレート誘導体は、その分子構造に応じて、膜の脂質組成を認識し、選択的に撹乱することが示された。興味深いことに、ポリマーは疎水性側鎖における構造の違いに依存して、異なる膜の破壊機構を示した。PM は、ある誘導時間を経た後に突然 GUV の破裂を引き起こす一方で、PB ポリマーは GUV の形態は保ったまま、ゆっくりと膜透過を誘導することが確認された。これらのポリマーによる膜破壊挙動は抗菌性ペプチドによるものと類似しており、それぞれ部分的な可溶化を示す Carpet モデルおよびポア形成モデルに対応すると考えられる[11]。また、PB において、スクロースの漏出が見られた条件であっても、分子量の大きなマーカー分子 (RITC-dextran, MW = 70 kDa, D_{hy} = 12 nm)は漏出しなかったことから、PB の形成するポアはサイズが決まっていることが示された。以上から、ポリメタクリレート誘導体は、ペプチドのように決まったモノマー配列を有しないものの、HDP と類似のメカニズムによって膜を破壊していることが明らかになった。

3-2. 抗菌性ポリメタクリレートによるドメイン形成

細胞膜において、ある特定の脂質分子や膜タンパク質が局在化するドメイン形成は、シグナル伝達等の多くの重要な生体機能に関わっている。[12] 抗菌性の発現においても、ドメイン形成に伴う不均一な膜構造の関与が指摘されており、Epand らは、複数のカチオン性の抗菌性ペプチドによって、細菌の細胞膜に存在する負電荷脂質がクラスター化し、膜の不安定化が誘導されることを提唱している。[13] ここでは、ポリメタクリレート誘導体によって引き起こされる膜ドメインの形成挙動を評価した例を述べる。[14]

Texas Red® 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (TR-DHPE)を修飾した POPE / POPG (8:2) GV を静置水和法によって調製し、ポリマー添加前後における蛍光の局在を評価した。添加前は、

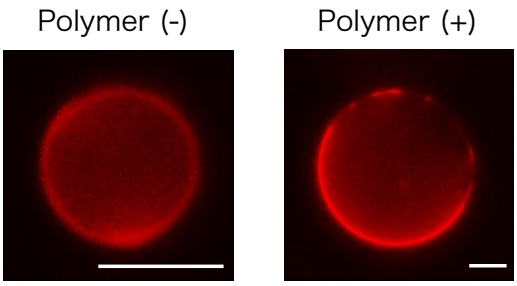


Figure 5. Domain formation in a bacterial model GV induced by an antimicrobial polymethacrylate derivative. Bar = 10 μm. Figures are modified from [14]. Copyright 2022, Springer Nature.

GUV 上で均一な蛍光が観察され、両脂質は混和していることが確認された(Fig. 5)。そこへポリマーを添加したところ、蛍光シグナルの明暗が異なる領域が出現し、不均一な膜となることが確認された。同様の組成によって調製されたリポソームを用いた示差走査熱量(DSC)測定において、ポリマーの添加により POPE に富む相が形成されることが確認された。以上より、ポリメタクリレート誘導体は、HDP と同様に酸性脂質をクラスター化することで相分離ドメインを形成することがわかった。

また、末端に蛍光発色団(ローダミン)を修飾したポリマーを用いることで、GV 上におけるポリマーの結合およびその局在に関しても評価できる。POPE/POPG GV にポリマーを添加したところ、徐々に膜上での蛍光強度が上昇したことから、ポリマーが膜へ結合する様子が確認された。興味深いことに、ポリマー添加初期では、膜上で均一な蛍光が観察された一方で、時間の経過に伴って明暗の異なるドメインの形成が確認され、ポリマーは膜上の特定の部位に局在化することが明らかになった。膜上の蛍光強度は、シグモイド状の時間依存性を示したことから、ポリマーの結合には協同性があることがわかった。特に、ポリマーの結合量が急激に増加する時間と、膜上で不均一な蛍光シグナルが観察された時間は良い一致がみられたことから、脂質ドメインの形成によってさらにポリマーを受け入れることのできる空の結合サイトが形成されると考えられ

る。以上より、ポリメタクリレート誘導体は、一部のHDPと同様に細菌の細胞膜上でドメイン構造を形成することが明らかになった。

4.脂質ナノディスクを形成するタンパク質と合成高分子による模倣

脂質分子と複合化することで、膜の形態変化を誘導するタンパク質がいくつか知られている。善玉コレステロールとして知られる高比重リポタンパク質(HDL)は、その初期過程でディスク状の脂質二分子膜-タンパク質複合体を形成する。HDL を構成するアポリポタンパク質である Apo A-I は243残基のアミノ酸残基によって形成される 10 個のα-ヘリックスより構成されている。それぞれのα-ヘリックスは先の HDP でみられたものと類似の facially amphiphilic structure を有している。HDL では、脂質二分子膜の疎水性端部を2本の両親媒性α-ヘリックスが覆うように結合することで、ディスク構造が安定化されると考えられている(Fig. 6)。

膜タンパク質の解析を目的として、Apo A-I の構造を改変することで、脂質ナノディスク形成に特化した膜骨格タンパク質(Membrane Scaffold Protein, MSP)が Sligar らによって開発された。[15]これまでに、両親媒性α-ヘリックスの長さが異なる種々の MSP 変異体が設計されており、9.8～12.9 nm の範囲で決まった直径を有するナノディスクを形成することができる。MSP ナノディスクは，核磁気共鳴(NMR)や生化学的アッセイと組み合わせることで、構造が未知のものも含む多様な膜タンパク質をより天然に近い状態で解析することができる。[16]

MSP 以外にも合成高分子を用いた脂質ナノディスクの形成もいくつか報告例がある。代表的なナノディスク形成ポリマーとして、スチレン-マレイン酸共重合体(SMA)が挙げられる。SMA はリン脂質と混合するだけで自発的にナノディスクを形成可能であり、リポソームのみならず、生きた細胞膜からそのままナノディスクを形成することができる。MSP 同様、SMA も多様な膜タンパク質の構造・機能解析にこれまで適用されている。[17]

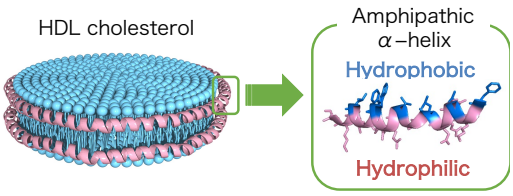


Figure 6. Formation of discoidal HDL cholesterol by Apo A-I proteins with amphipathic helices.

5. 両親媒性ポリメタクリレート誘導体によるナノディスク形成

筆者らはこれまでに、ポリメタクリレートを分子骨格として用いた脂質ナノディスク形成ポリマーを設計した(Fig. 7A)[18]。このナノディスク形成ポリマーは、親水性のコリン基と疎水性のブチル基を側鎖に持つ両親媒性のランダム共重合体である。目的とするポリマーは、フリーラジカル重合によってワンポットで簡便に合成できるため、様々な構造バリエーションを持つ分子ライブラリーを構築する上で大きなアドバンテージとなる。親疎水性モノマー比および分子量を変化させたポリマーライブラリを対象に、1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC)リポソームを用いたスクリーニングを行ったところ、メタクリル酸ブチルを約 40-60% 含み、平均分子量が 3,000-9,000 g・mol^{-1} の範囲にあるポリマーは脂質膜を効率的に断片化し、流体力学的半径(D_{hy})が数十 nm の分子集合体を形成することが動的光散乱(DLS)の測定より明らかになった(Fig. 7B)。ポリマーと脂質を 1:8 のモル比で混合して得られた複合体の透過型電子顕微鏡(TEM)観察を行ったところ、直径約 20 nm, 厚み 5.5 nm の均一なディスク構造が観察された(Fig. 7C)。平均分子量から予想されるポリマーの長さは、ナノディスクの円周長よりも顕著に短いことから、ナノディスクの端部は、複数のポリマー鎖で覆われていると考えられる。この特徴を利用して、ポリマーと脂質の組成比を変えることで 8～20 nm の範囲で様々なサイズのナノディスクを形成することが可能である。組成比を変えるだけで様々なサイズのナノディスクを得られる点は、MSP と比較した場合の本ポリマー系における大きな利点である。得られたナノディスクを

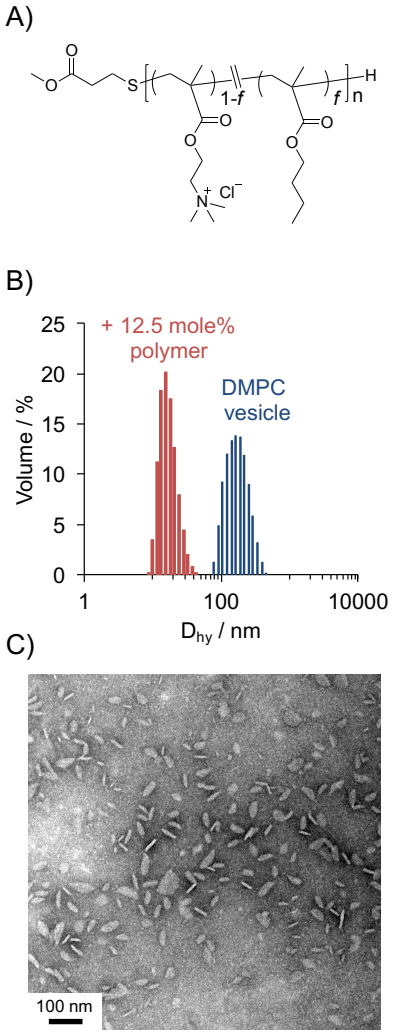


Figure 7. Formation of lipid nanodiscs. A) Chemical structure of nanodisc-forming polymer, B) Size distribution of nanodiscs determined by DLS, C) Negative-stain TEM image of lipid nanodiscs. Figures are modified from [18]. Copyright 2017, American Chemical Society.

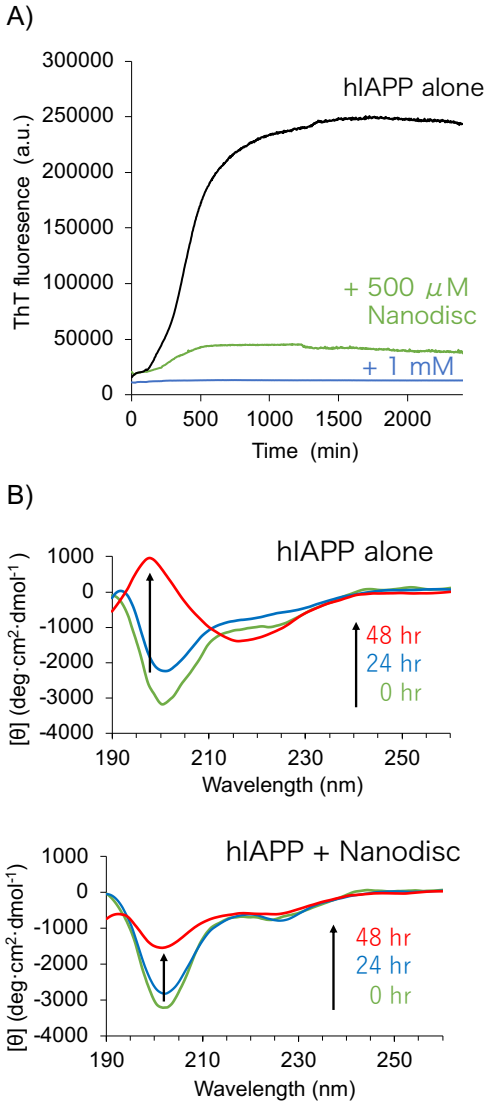


Figure 8. Interaction of human islet amyloid polypeptide (hIAPP) with lipid nanodiscs evaluated by Thioflavin T (ThT) fluorescence (A) and circular dichroism (CD) (B). Figures are modified from [18]. Copyright 2017, American Chemical Society.

DSC 測定によって評価したところ、脂質二分子膜のゲル−液晶相転移に対応する吸熱ピークが確認されたことから、リン脂質単独で形成される脂質膜の物性を保持した状態でナノディスク化されていることが確認された。

本ポリマーによって形成される脂質ナノディスクは、紫外および可視光領域において顕著な吸収を示さないため、脂質二分子膜と相互作用する様々な生理活性分子の分光学的な評価に直接適応することが可能である。2 型糖尿病への関与が知られるヒト膵島アミロイドポリペプチド（hIAPP）のアミロイド繊維形成挙動について脂質ナノディスクを用いて評価した。チオフラビン T を用いた蛍光測定により、脂質ナノディスクの存在下において、hIAPP の繊維形成が著しく抑制されることがわかった(Fig. 8A)。また、得られた試料について円偏光二色性（CD）測定を用

いて評価したところ、hIAPP はナノディスクの非存在下では β-シートに富むアミロイド線維が形成されるのに対し、ナノディスク共存下では α-ヘリックス構造を有する hIAPP オリゴマーが形成されることがわかった(Fig. 8B)。このことは、ナノディスクの表面積は小さく、同一の膜に結合することができる hIAPP の分子数が制限されることを反映した結果であると考えられる。同様に、本ナノディスクは、アルツハイマー病に関連するアミロイド β タンパク質(A β)の繊維形成についても阻害することが可能であり、A β の神経毒性を低減させる作用があることも明らかになっている[19]。このように、合成高分子を用いて形成された脂質ナノディスクは、膜に相互作用する生理活性分子の作用機構評価のみにとどまらず、それ自身が生理活性を示す新たな機能性材料としての応用展開も今後期待される。

6. おわりに

本稿では、天然に存在する抗菌性ペプチドおよびアポリポタンパク質にヒントを得て開発した抗菌性ポリマーおよび、ナノディスク形成ポリマーを取り上げ、その設計指針および機能評価について紹介した。これまでの研究でデザインした膜に作用する合成高分子は、いずれもタンパク質やペプチドのように決まったモノマー配列をもたないランダム共重合体であるが、お手本となった天然の分子と類似の生体機能を誘導することが可能である。生体膜をターゲットとした機能性分子の創出においては、タンパク質やペプチドの構造に由来する物理化学的な特徴を捉え、それを再現できるシンプルな分子設計を行うことが重要であると考えられる。

7. 謝辞

本研究は、奈良先端科学技術大学院大学・バイオミメティック分子科学研究室・菊池純一名誉教授および研究室に所属する学生の協力を得て進めた。また得られた成果の一部は、Prof. K. Kuroda および Prof. A. Ramamoorthy（米・ミシガン大学）との共同研究によって得られた。また、本研究は科学研究費補助金　基盤研究(B) 18H03533、挑戦的研究(萌芽) 21K19007 および学術変革領域研究(A)　分子サイバネティクス領域　公募研究　21H05883 の支援を受けて実施した。

参考文献

1) R. B. Gennis, Biomembranes: Molecular Structure and Function, **1989**, Springer.
2) M. Zasloff, *Nature*, **2002**, *415*, 389-395.
3) M. Zasloff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, *84*, 5449-5453.
4) T. Ikeda, S. Tazuke, Y. Suzuki, *Macromol. Chem.*, **1984**, *185*, 869-876.
5) C. Ergene, K. Yasuhara, E. F. Palermo, *Polym. Chem.*, **2018**, *9*, 2407-2427.
6) K. Kuroda, G. Caputo, W. F. DeGrado, *Chem. -Eur. J.*, **2009**, *15*, 1123-1133.
7) K. Kuroda, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 4128-4129.
8) E. F. Palermo, K. Kuroda, *Biomacromolecules*, **2009**, *10*, 1416-1428.
9) H. Takahashi, K. Yumoto, K. Yasuhara, E. Nadres, Y. Kikuchi, R. Taichman, K. Kuroda, Sci. Rep., **2019**, *9*. 1096.
10) M. Tsukamoto, E. Zappala, G. Caputo, J. Kikuchi, K. Najarian, K. Kuroda, K. Yasuhara, *Langmuir*, **2021**, *37*, 9982-9995.
11) Y. Shai, *Biopolymers*, **2002**, *66*, 236-48.
12) K. Simons, D. Toomre, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2000**, *1*, 31-39.
13) R. Epand, R. Epand, *J. Pept. Sci.*, **2011**, *17*, 298-305.
14) K. Yasuhara, M. Tsukamoto, J. Kikuchi, K. Kuroda, *J. Membr. Biol.*, **2022**, doi: 10.1007/s00232-022-00220-6.
15) T. H. Bayburt, Y. V. Grinkova, S. G. Sligar, *Nano Lett.*, **2002**, *2*, 853-856.
16) S. G. Sligar, I. G. Denisov, *Protein Sci.* **2021**, *30*, 297-315.
17) M. D. Farrelly, L. L. Martin, S. H. Thang, *Chem. -Eur. J.*, **2021**, *27*, 12922-12939.
18) K. Yasuhara, J. Arakida, T. Ravula, S. K. Ramadugu, B. Sahoo, J. Kikuchi, A.

Ramamoorthy, *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*, 18657-18663.
19) B. R. Sahoo, T. Genjo, M. Bekier, S. J. Cox, A. K. Stoddard, M. Ivanova, K. Yasuhara, C. A. Fierke, Y. Wang, A. Ramamoorthy, *Chem. Commun.,* **2018**, *54*, 12883-12886.